

**Methode zur Differenzierung extra-
und intrazellulärer Störungen der Gewebsatmung**

von

Klaus Tillig

aus Mitterteich/Opf.

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Erlangen.
Direktor: Prof. Dr. med. F. Heim

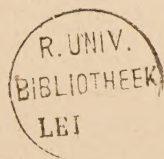
**Methode zur Differenzierung extra-
und intrazellulärer Störungen der Gewebsatmung**

Inaugural – Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Friedrich – Alexander – Universität
zu
Erlangen

vorgelegt von

Klaus Tillig

aus Mitterteich





Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548210_0075

Gedruckt mit Erlaubnis der Medizinischen Fakultät der
Universität Erlangen.

D e k a n:

Professor Dr. med. F. Heim

Referent:

Professor Dr. med. F. Heim

Tag der mündlichen Prüfung: 15. Dezember 1958

Einleitung

Die Senkung der Sauerstoffaufnahme isoliert durchströmter Organe kann bei ausreichendem Sauerstoffangebot in der Durchströmungsflüssigkeit intrazelluläre und extrazelluläre Ursachen haben. Im ersten Fall kann ihr eine Abnahme des Energiebedarfs, abhängig vom Grad der Schädigung, durch eine allgemeine Desorganisation der Atmungssysteme, oder die Hemmung spezifischer Atmungsfermente der Zellen zugrunde liegen. Als extrazelluläre Ursache wird hauptsächlich – einen ausreichenden Sauerstoffpartialdruck im Kapillarsystem vorausgesetzt – die Erschwerung der Sauerstoffdiffusion vom Kapillarlumen zu den Organzellen in Frage kommen. Eine der häufigsten Ursachen für die Störung des Sauerstoffaustausches zwischen Blut und Körperzellen bildet das interstitielle Ödem, meist hervorgerufen durch Schädigungen mechanischer, thermischer, toxischer, bakterieller oder allergischer Genese. Sie führen durch Änderungen der Gefäßweite und Kapillardurchlässigkeit, durch Eiweißzerfall, pH-Verschiebung und Erhöhung des osmotischen Gewebedruckes zum Austritt von Blutwasser, später von Serum und Plasma aus der Gefäßbahn in die interstitiellen Räume.

In den über das Gefäßsystem mit Sauerstoff versorgten Organen nimmt die Sauerstoffkonzentration von der Kapillare bis zur Peripherie eines zylindrischen, von dieser Kapillare versorgten Gewebsteiles nach der Formel

$$p = 760 - \frac{A \cdot R^2 \cdot f}{D}$$

ab. In dieser vereinfachten Formel ist A der Sauerstoffverbrauch, R der halbe Abstand zweier benachbarter Kapillaren, D die Diffusionskonstante im Gewebe, f eine Größe, die vom Radius der Kapillare und der Gestalt des Gewebes abhängt. Nach dieser Formel nimmt der Sauerstoffpartialdruck von der Kapillare in der Richtung zur Gewebesperipherie um so mehr ab, je größer der Sauerstoffbedarf der Organzellen (A), der räumliche Abstand der Organzellen von der Kapillare (R) und die lichte Weite des Gefäßes (f) sind. Ein interstitielles Ödem, das die Gewebszellen voneinander und der versorgenden Kapillare zur Gewebesperipherie vergrößert, kann in den peripher gelegenen Gewebsteilen zu derart niedrigen Sauerstoffpartialdrücken führen, daß dort die Atmung aus Sauerstoffmangel absinken muß. Zur Beantwortung der Frage, ob unter der Einwirkung schädigender Stoffe Änderungen der Gewebsatmung als Folge einer direkten Schädigung der Organzellen oder aber Folge eines stark erniedrigten Sauerstoffangebotes an die Gewebszellen in Folge einer Verlängerung des Diffusionsweges vom Gefäßlumen zur Zelle aufzufassen sind, erscheint es uns notwendig, am gleichen Versuchstierkollektiv neben der Atmungsgröße von Gewebsschnitten gleichzeitig die

Sauerstoffaufnahme aus der Durchströmungsflüssigkeit am isoliert durchströmten Gesamtorgan zu messen.

Die Bestimmung der Sauerstoffaufnahme der Gewebsschnitte erfolgt am besten nach der Methode von Warburg. Der nach der Formel

$$\frac{\text{O}_2\text{-Verbrauch in mm}^3}{\text{Trockengewicht des Gewebes in mg Std.}}$$

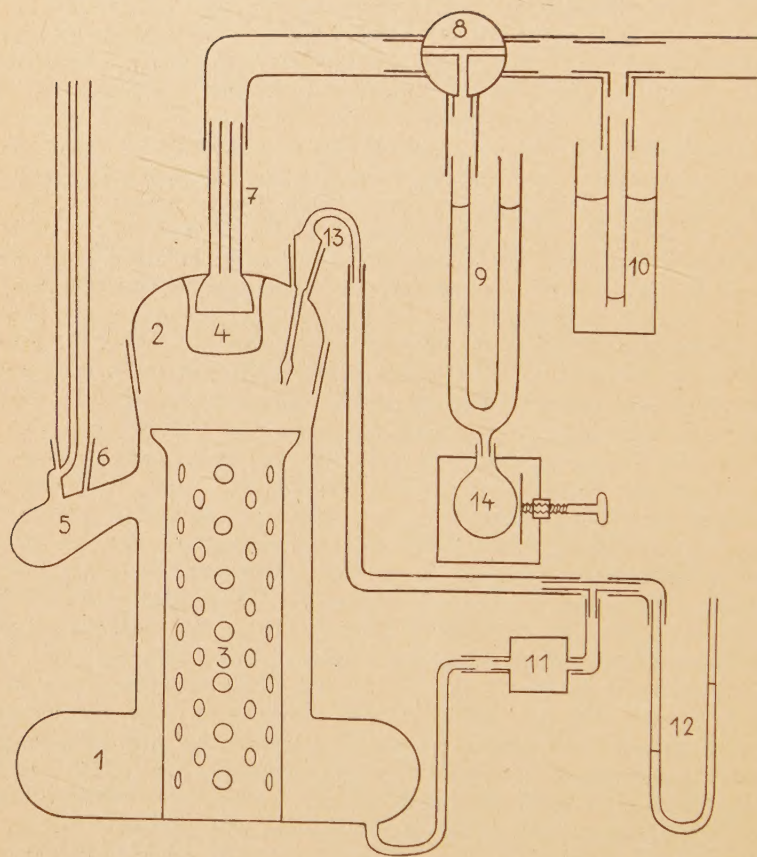
berechnete Q_{O_2} ist ein direktes Maß der Atmungsgröße. Ein interstitielles Ödem ist darauf ohne Einfluß, wenn die Schichtdecke der Gewebsschnitte, die in reiner Sauerstoffatmosphäre atmen, weniger als $4,7 \times 10^{-2}$ cm beträgt; denn unter diesen Bedingungen atmen nach den Befunden von Warburg an Schnitten von Säugetierlebern auch die von der Oberfläche entferntesten Zellen der Gewebsschnitte noch optimal.

Da die Messung des Sauerstoffverbrauchs von Gewebsschnitten im wesentlichen nur über intrazelluläre Störungen Aufschluß gibt, haben wir eine Apparatur entwickelt, mit deren Hilfe die extrazellulären Ursachen einer Atmungsstörung erkannt werden können, wenn diese in einer Erschwerung der Sauerstoffdiffusion vom Gewebslumen zur Organzelle bestehen.

Eine neue Methode der Durchströmung und Messung des Sauerstoffverbrauchs isolierter Warmblüterorgane.

Die Apparatur eignet sich zur Durchströmung von Kleintierorganen, insbesondere von Mäuselebern, Meerschweinchennieren u.a. Sie gestattet in Verbindung mit der Bestimmung der Atmungsgröße von Organschnitten an einer größeren Zahl von Versuchstieren intrazelluläre und extrazelluläre Ursachen einer Änderung der Sauerstoffaufnahme annähernd quantitativ zu unterscheiden.

Die Apparatur, die Abb. 1 schematisch darstellt, besteht im einzelnen aus einem oben offenen und mit einem Schliff versehenen etwa 10 cm hohem Gefäß von 200 ml Fassungsvermögen, dessen unterer erweiterter Teil als Reservoir für Durchströmungsflüssigkeit (20 bis 30 ml) dient. In der Mitte des Gefäßes befindet sich der Oxygenator. Er besteht aus einem in den Boden eingeschmolzenen mit Glasperlen gefüllten, oben offenen Glaszylinder, dessen Wand vielfach durchlöchert ist. Auf der obersten Glasperlenschicht liegt das zu durchströmende Organ. Der Deckel des Gefäßes, mit dem nach Einbringen des zu durchströmenden Organs das Gefäß dicht verschlossen wird, enthält das Absorptionsgefäß für CO_2 . Ein in den Deckel eingeschmolzenes Glasrohr stellt die Verbindung zwischen dem Gasraum des Gefäßes und dem mit Brodie'scher Lösung gefüllten Volumeter her. Über einen Dreiwegehahn kann wahlweise die Verbindung zwischen Gefäßinnerem und Volumeter bzw. zwischen Gefäßlumen und einer Sauerstoffbombe hergestellt werden. Die Organdurchströmung erfolgt mittels einer Schlauchpumpe, die aus dem Reservoir kontinuierlich Flüssigkeit durch das Gefäßsystem der Leber hindurchpumpt. Hierzu wird ein in der Pfortader der Leber liegender PVC-Katheter (äußerer $\varnothing$ 1mm) mit der inneren Öffnung eines in den Gefäßdeckel eingeschliffenen Glasröhrchens verbunden, dessen äußere Öffnung über Ventilmischschläuche mit der Pumpe und einem Quecksilbermanometer in Verbindung steht. Die aus den Lebervenen austretende, über die Glasperlen in das Reservoir abtropfende Durchströmungsflüssigkeit wird durch die große Oberflächenentwicklung und die Schüttelbewegungen des Gefäßes im Thermostat kontinuierlich mit Sauerstoff gesättigt. Das Gefäß enthält schließlich ein birnenförmiges Ansatzstück zur Aufnahme von gelösten Stoffen, die während des Versuchs der Durchströmungsflüssigkeit zugesetzt werden sollen und ein weiteres in der Ansatzbirne sitzendes, durch Drehen im Schliff verschließbares Glasrohr, durch welches das in das im Thermostat befindliche Atmungsgefäß eingeleitete Gas wieder entweichen kann.



Bezeichnung der Einzelteile der Durchströmungsapparatur

- 1 Gefäß
- 2 Deckel des Gefäßes
- 3 Oxygenator, gefüllt mit Glaskugeln oder kurzen Glasröhren
- 4 Laugennapf zur Absorption von CO_2
- 5 Seitenarm zur Aufnahme von während dem Versuch zuzusetzenden Pharmaka
- 6 Schliff, der Verbindung des Gefäßes mit der Außenwelt herstellt während der O_2 -Durchströmung der Apparatur, dann durch Drehung geschlossen werden kann
- 7 Rohr, das Verbindung zwischen dem Gefäß, Sauerstoffflasche und Volumeter herstellt
- 8 Dreiwegehahn, der wahlweise Verbindung zwischen Gefäß, Volumeter und Sauerstoffflasche oder nur zwischen Gefäß und Volumeter herstellt
- 9 Volumeter, mißt Volumenänderung im Gefäß
- 10 Ventil zwischen Sauerstoffflasche und Volumeter
- 11 Durchströmungspumpe (Schlauchpumpe)
- 12 Quecksilbermanometer, zeigt den Pumpdruck an
- 13 Schliff, an dem das Leberkatheter befestigt wird
- 14 Vorrichtung, die beiden Meßflüssigkeitsspiegel in den Schenkeln des Volumeters in gleiche Höhe zu stellen.

Durchführung der Durchströmungsversuche

Nach Töten des Tieres wird das Abdomen sofort geöffnet, das gesamte Darmkonvolut auf die rechte Seite geklappt, die nunmehr auf dem Mesenterium sichtbare Pfortader freipräpariert, eingeschnitten und in die Öffnung ein PVC-Katheter eingebunden. Die Leber ist zur Entblutung sofort mit Durchströmungsflüssigkeit zu durchspülen, nachdem die ebenfalls sichtbare untere Hohlvene eingeschnitten wurde. Nach Anschluß an die Durchströmungspumpe wird das Organ noch einmal mit 20 bis 30 ml Flüssigkeit durchspült. Dabei kann der Pumpdruck (25 bis 30 mm Hg) eingestellt und das Minutenvolumen (8 bis 16 ml) an der aus den Lebervenen austretenden Flüssigkeit bestimmt werden. Nach Einbringen der Leber und Verschuß des Gefäßes durch aufsetzen des Deckels wird die Apparatur in den Thermostat gehängt und der Gasraum mit Sauerstoff durchströmt. Nach Verschuß der Öffnung 6 wird das Gefäß über den Dreiwegehahn mit dem Volumeter verbunden. Die Sauerstoffmessung beginnt nach dem Erreichen der Temperaturkonstanz im Gefäß.

Als *Durchströmungsflüssigkeit* wurde eine Lösung folgender Zusammensetzung verwendet:

0,108 m NaCl; 0,012 m KCl; 0,030 m Phosphatpuffer nach Sörensen von pH 7,4; 0,06 m CaCl_2 ; 0,05 m MgCl_2 ;

Als Atmungssubstrat wurden 0,05 m Natriumpyruvat zugesetzt. Die Sättigung der Durchströmungsflüssigkeit erfolgt durch den Oxygenator. Er dient zur Vergrößerung der sauerstoffaufnehmenden Flüssigkeitsoberfläche, wobei gleichzeitig durch die Schüttelbewegungen des Gefäßes die Sauerstoffkonvektion gefördert wird. Artfremdes Blut oder Erythrozytensuspensionen als Durchströmungsflüssigkeit haben sich nicht bewährt, artgleiches Blut ist bei Verwendung von Mäusen als Versuchstiere nicht in ausreichender Menge zu gewinnen. Da Blut eine Viskositätskonstante von 4 bis 5 hat, fließt unter gleichem Druck bei Verwendung von Blut nur $\frac{1}{4}$ des Volumens einer wässrigen Lösung durch die Leber.

Die Messung des Sauerstoffverbrauchs.

Aus zwei Gründen wurde der manometrischen die volumetrische Messung des Sauerstoffverbrauchs vorgezogen: Bei Verwendung der manometrischen Methode würde durch die Gefäßkonstante, die über 5,0 liegt, leicht ein größerer Meßfehler auftreten. Außerdem ändert sich bei manometrischer Messung gleichzeitig mit dem Innendruck des Gefäßes der Durchströmungswiderstand in der Leber und damit in unkontrollierbarer Weise auch das Minutenvolumen. Das verbrauchte Sauerstoffvolumen wurde deshalb unter Konstanthaltung des Gefäßvolumens und Gefäßinnendruckes gemessen, indem mittels einer Kompressionsschraube aus dem mit Brodie-Flüssigkeit gefüllten mit dem Volumeter verbundenen Gummiballon in kurzen Zeitabständen Flüssigkeit bis

zum Meniskengleichstand in beiden Schenkeln des Volumeters nachgefüllt wurde. Die Umrechnung auf normale Bedingungen erfolgte nach der allgemeinen Zustandsgleichung für Gase

$$\frac{v_o \cdot p_o}{T_o} = \frac{v_w \cdot p_w}{T_w}$$

Dabei bedeutet:

v_o = reduziertes Volumen

v_w = gemessenes Volumen

p_o = 760 mm Hg

p_w = gemessener Druck

T_o = -273° C

T_w = $273 + t$

t = 38° C

$$v_o = \frac{v_w \cdot T_o \cdot p_w}{p_o \cdot T_w}$$

Da in unseren Versuchen

$$\frac{T_o \cdot p_w}{p_o \cdot T_w} = \frac{273 \cdot 760}{760 \cdot 311} = 0,878 = \text{konst.}$$

ist, ergibt sich für $v_o = v_w \cdot \text{konst.} = v_w \cdot 0,878$

Das Sauerstoffangebot

Der von uns verwendete Pumpdruck lag im Bereich des Kapillardrucks zwischen 25 und 30 mm Hg. Das Minutenvolumen betrug bei diesem Druck 8 bis 16 ml pro Minute. Legt man den Bunsenschen Absorptionskoeffizienten von 0,024 für O_2 m Ringerlösung bei 38° zugrunde, so werden bei einem Minutenvolumen von 8 bis 16 ml dem durchströmten Organ in der Stunde 11,5 bis 23 ml O_2 angeboten. Hiervon verbraucht nach unseren Beobachtungen die Mäuseleber nie mehr als 9 ml O_2 pro Stunde.

Kriterien über die Auswertbarkeit der Versuche

Plötzlicher Anstieg des Pumpdrucks während der Durchströmung wird meist durch einen Thrombus in der Pfortader oder im Katheter erzeugt. Langsames, stetiges Ansteigen deutet auf Ödembildung, ein kurzer, reversibler Anstieg auf vasomotorische Effekte hin. Nach Staub bildet die nur durch die Vena portae durchströmte Leber ein Ödem. Ein solches wurde von uns trotz Verwendung einer kolloidfreien Durchströmungsflüssigkeit nur beobachtet, wenn das Sauerstoffangebot wegen Thrombosierung unzureichend war. Das Ödem ging deshalb immer mit einem erniedrigten QO_2 einher. Versuche mit sehr niedrigem QO_2 wurden deshalb nicht verwertet.

Messung des Sauerstoffverbrauchs von Leberschnitten und isoliert durchströmten Lebern mit CCl_4 vorbehandelter weißer Mäuse

Die nun folgenden Versuchsergebnisse, die an Tetrachlorkohlenstoff – vergifteten weißen Mäusen gewonnen wurden, dienen als Beispiel für die Möglichkeit einer Differenzierung intra – und extrazellulärer Störungen der Gewebsatmung. Die Tiere erhielten 0,5 ml Tetrachlorkohlenstoff / kg Körpergewicht intraperitoneal und wurden 24 bzw. 48 Stunden nach der Injektion getötet. In gleicher Weise wie bei den Kontrollversuchen mit unbehandelten Mäusen wurden die Lebern der einen Hälfte der Versuchstiere zu Durchströmungsversuchen verwendet, aus den Lebern der anderen Tiere wurden Schnitte hergestellt, deren Atmung in der Warburg - Apparatur gemessen wurden.

Intrazelluläre Ursachen der Atmungsstörung

Wie aus der Tabelle, in der die Versuchsergebnisse zusammengefaßt wurden, hervorgeht, ist 24 und 48 Stunden nach der CCl_4 – Injektion die Atmung der Leberschnitte gegenüber normalen Leberschnitten signifikant erniedrigt. Dieses Ergebnis steht in Übereinstimmung mit den Befunden von Christie und Judah, sowie Heim, Leuschner und Ott, die eine Atmungshemmung an Leberschnitten beobachteten, die von CCl_4 – vergifteten Ratten und Meerschweinchen stammten. Christie und Judah erklären diese Atmungsstörung nicht mit einer spezifischen Hemmung einzelner Fermente, sondern mit der strukturellen Desorganisation der Enzymsysteme der Lebermitochondrien. Für diese Erklärung spricht das auch an unseren Versuchstieren beobachtete, für die CCl_4 Vergiftung charakteristische histologische Bild der zentralen Läppchennekrose und fein – bis grobtröpfigen Verfettung des erhaltenen Leberparenchyms.

Tabelle

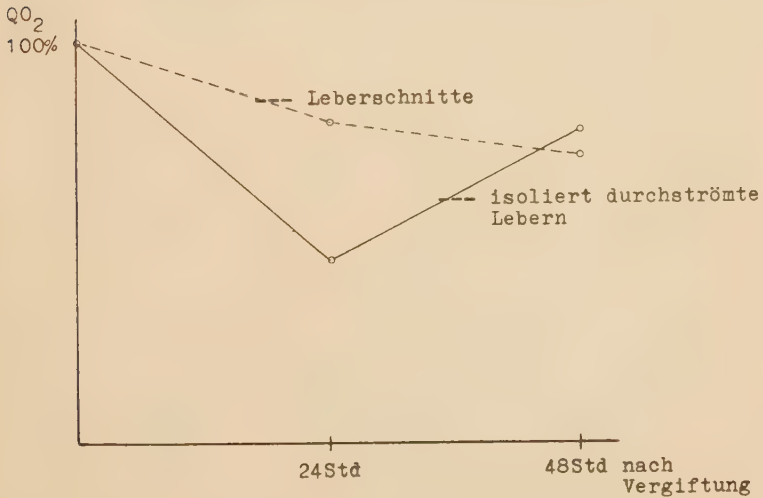
Durchströmung isolierter Lebern

	N	QO ₂	Σ	P	Volumenänderung während der Durchströmung
unbehandelte Tiere	7	20,7	2,2		- 10,3 %
24 Std. nach 0,5 ml/kg CCl ₄ intraperitoneal	8	9,4	1,7	0,001	+ 12,9 %
48 Std. nach 0,5 ml/kg CCl ₄ intraperitoneal	7	16,2	2,2	0,05	+ 1,5 %

Leberschnitte

	N	QO ₂	Σ	P
unbehandelte Tiere	30	15,5	2,4	
24 Std. nach 0,5 ml/kg CCl ₄ intraperitoneal	39	12,0	5,2	0,001
48 Std. nach 0,5 ml/kg CCl ₄ intraperitoneal	11	11,1	1,1	0,01

Graphische Darstellung der prozentualen Atmungsänderung von isoliert durchströmten Lebern und Leberschnitten



Extrazelluläre Ursachen der Atmungsstörung

Die Befunde an den 24 Stunden nach der CCl_4 Vergiftung isoliert durchströmten Lebern weichen insofern von denen an Leberschnitten ab, als der QO_2 der durchströmten intakten Lebern stärker abgenommen hat als der der Leberschnitte. 48 Stunden nach der CCl_4 - Verabreichung dagegen sind die QO_2 der durchströmten Lebern und der Leberschnitte, ausgedrückt in % der Normalwerte, nahezu gleich. Die Abnahme des QO_2 der 24 Stunden nach der Tetrachlorkohlenstoffvergiftung durchströmten Leber beruht zu einem Teil auf der entsprechenden prozentualen Abnahme des QO_2 der Schnitte, die einer unmittelbaren Zellschädigung bzw. Hemmung der Atmungsenzyme entspricht. Eine weitere Ursache für die Senkung des QO_2 der durchströmten Lebern muß in der Erschwerung der Sauerstoffdiffusion liegen, für die man wohl ein interstitielles Ödem verantwortlich machen darf. In diese Richtung deutet die starke Volumenzunahme der 24 Stunden nach der Vergiftung durchströmten Lebern. In ihr kommt die gesteigerte Tendenz des geschädigten Lebergewebes zur Flüssigkeitsretension zum Ausdruck. Da 48 Stunden nach der Tetrachlorkohlenstoffverabreichung der QO_2 der durchströmten Lebern von dem der Leberschnitte (in % der Norm) nicht mehr nennenswert abweicht, und die Lebern eine erheblich geringere Tendenz zur Wasserretension während der Durchströmung zeigen, kann die Ursache für die Senkung der O_2 - Aufnahme nur noch in einer Störung der zellulären Atmungssysteme ihren Grund haben.

Ergebnis der Untersuchungen

Von den mit 0,5 ml CCl_4/kg vergifteten weißen Mäusen starb die Hälfte. Davon gingen etwa 95% in den ersten 48 Stunden nach der Injektion zugrunde. Da diese hohe Letalität zeitlich mit der Phase zusammenfällt, in der die Gewebsatmung weniger aus intrazellulären als extrazellulären Ursachen gestört war, scheint die akute Giftigkeit des CCl_4 weniger auf der Schädigung der Zellstrukturen und Atmungsfermente als auf einer Gewebsanoxie als Folge der Erschwerung der Sauerstoffdiffusion zu beruhen.

Zusammenfassung

Zur Differenzierung von Störungen der Gewebsatmung in extra- und intrazelluläre Ursachen werden zwei Methoden angewendet, um die Gewebsatmung zu messen:

Die Warburgsche Methode zur Messung der Atmung von Gewebsschnitten, die nur intrazelluläre Atmungsstörungen, und ein von uns entwickeltes Durchströmungsverfahren intakter isolierter Organe, das intra- und extrazellulär bedingte Atmungsstörungen anzeigt. Durch Vergleich der prozentualen Abweichung der Gewebsatmung von Organen bzw. Organschnitten vorbehandelter und unbehandelter Tiere wird diese Differenzierung ermöglicht.

Es ergab sich, daß die Atmungssenkung von Lebern mit Tetrachlorkohlenstoff vorbehandelter Tiere gegenüber denen unbehandelter Tiere in den ersten 24 Stunden vorwiegend extrazelluläre Ursachen, wahrscheinlich in Form einer Sauerstoffdiffusionshemmung zwischen Kapillare und Zelle durch ein interstitielles Ödem, zur Ursache hat. Nach 48 Stunden ist die Atmungshemmung allein durch intrazelluläre Ursachen in Form einer Fermentschädigung bedingt.

Literatur

- | | |
|---|--|
| Adams, D.H., and F.J.C. Roe | Brit. J. Canc. 7, 509, (1953) |
| Bodo, R. and H.P. Marks | Journ. of. Physiology 65, 48, (1928)
„The Action of Insulin on the Perfused Mammalian liver“ |
| Burton – Opitz | Quart. journ. of exp. Physiol.
4, 113, (1911)
3, 297, (1910) |
| Christie, G.S., and J.D. Judah | Proc. Roy. Soc. Lond. 142, 411, (1954) |
| Frunder, Horst | Arch. exper. Path. u. Pharmakol.
223, 158, (1954)
„pH-Messungen im lebenden Gewebe mit besonderer Berücksichtigung des Pankreas“
Zeitschrift für Physiol. Chemie
291, 182, (1952)
295, 77, (1953) |
| Heim, Fritz, Fred Leuschner
und Georg Wunderlich | Klinische Wochenschrift 35. Jahrg.,
16. Heft, S. 823 (1957) |
| Heim, Fritz, Fred Leuschner
und Alfred Ott | Arch. exper. Path. u. Pharmakol.
229, 360, (1956)
„Der Einfluß von Tetrachlorkohlenstoff auf die Ferment. und Co-Enzym A A-Aktivität der Leber“ |
| Patwardhan, M. V.,
V. Ramalingaswami,
S. Sriramachari | Indian J. Med. Sci. 7, 533, (1953) |
| Schmid | Arch. exper. Path. u. Pharm.
125, 527, (1908) |
| Warburg, O. | „Über den Stoffwechsel der Tumoren“
Berlin (1926)
Arch. exper. Path. u. Pharm.
154, 599, (1913) |

Abschließend erlaube ich mir,
Herrn Prof. Dr. med. F. Heim für
die Überlassung des Themas
sowie Herrn Dr. med. F. Leuschner
für die freundliche Unterstützung
und Förderung dieser Arbeit
meinen aufrichtigen Dank zu
sagen!

Lebenslauf

Am 3. März 1932 wurde ich, Klaus Georg Max Tillig als Sohn des Kaufmanns Georg Tillig und seiner Ehefrau Dorothea, geb. Teschner in Schweidnitz/Schles. geboren.

Von 1938 bis 1942 besuchte ich die Volksschule und von 1942 bis 1945 die Oberrealschule in Langenbielau. Nach der Ausweisung aus Schlesien 1946 kam ich nach Mitterteich/Opf. und besuchte von da ab bis 1952 die Oberrealschule in Marktredwitz, wo ich die Reifeprüfung ablegte.

Im Wintersemester 1952/53 begann ich das Medizinstudium an der Friedrich-Alexander-Universität zu Erlangen, wo ich 1955 die medizinische Vorprüfung und 1958 die Medizinische Prüfung ablegte.

